

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
19 février 2004 (19.02.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/015096 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 9/64,
A61K 38/48, A61L 33/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002473

(22) Date de dépôt international : 6 août 2003 (06.08.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/10042 7 août 2002 (07.08.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : RI-
CARIMPEX [FR/FR]; 245, avenue de Saint Médard,
F-33320 Eysines (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : LA-
TRILLE, Jacques [FR/FR]; 245, avenue de Saint
Médard, F-33320 Eysines (FR). NIKONOV, Guennady,
I. [RU/RU]; Kamensky District, Pes Oktobriaskaya (RU).

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques. etc.; Cabinet
Regimbeau, 20 rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17
(FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM; ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 8 avril 2004

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: LEECH EXTRACTS FOR STENTS

(54) Titre : EXTRAITS DE SANGSUES POUR STENTS

(57) Abstract: The invention relates to a stable destabilase complex in the form of a monomer, which is capable of aggregating into a polymer destabilase complex forming a liposome and which can be obtained from medicinal leeches using the following method comprising: affinity chromatography with 6-keto-prostaglandin antibodies which are immobilised on a suitable column; and high ionic strength elution of the destabilase complex, said complex having an antithrombin activity of at least 700 ATU/mg, a plasma recalcification time of at least 800 APC/mg, a fibrinolytic activity of at least 40mm²/mg and an immunomodulating activity.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un complexe de destabilase stable, sous forme de monomère, capable de s'agréger en complexe destabilase polymère formant un liposome, susceptible d'être obtenu à partir de sangsues médicinales par un procédé comprenant: une chromatographie d'affinité avec lesdits anticorps de la 6-ketoprostaglandine immobilisés sur une colonne appropriée; - l'éluion à force ionique élevée du complexe destabilase, ledit complexe présentant une activité antithrombine d'au moins 700 ATU/mg, une durée de recalcification du plasma d'au moins 800 APC/mg, une activité fibrinolytique d'au moins 40mm²/mg, et une activité immunomodulatrice.

WO 2004/015096 A3

Extraits de sangsues pour stents

L'invention concerne l'obtention de substances biologiquement actives à propriétés cosmétiques ou pharmaceutiques se présentant sous forme de liposomes. Plus précisément ces liposomes sont des liposomes naturels extraits de sangsues médicinales. Ces liposomes naturels présentent des propriétés à la fois anti-coagulantes et immuno-modulatrices.

On connaît déjà des composés ayant des propriétés anti-coagulantes, tels que l'héparine, et des composés ayant des propriétés immuno-modulatrices. De tels composés sont utilisés en thérapeutique, et administrés par exemple par l'intermédiaire de supports physiquement acceptables dénommés « stents ».

Ces stents sont des endoprothèses, couramment utilisés en chirurgie cardiovasculaire pour être implantés dans un conduit vasculaire, notamment artère coronaire ou artère périphérique. Il est connu de traiter les maladies athéromateuses vasculaires, qui correspondent à des rétrécissements des artères, par des techniques de dilatation par ballonnet, techniques dénommées angioplasties. Le ballonnet est introduit dans l'artère, gonflé à une pression telle qu'il écrase le dépôt d'athéromes. Ces techniques n'étant toutefois pas toujours suffisantes, il est connu d'implanter dans le conduit vasculaire au niveau de la zone traitée par angioplastie, une endoprothèse plus communément appelée stent, typiquement support métallique agissant comme tuteur une fois qu'il est introduit à l'intérieur de l'artère au niveau de la zone traitée. De tels stents sont par exemple sertis sur le ballonnet, dans une position dite de repos, préalablement à l'introduction du ballonnet dans le conduit vasculaire. Une fois le stent acheminé jusqu'à la zone d'implantation à l'intérieur du conduit vasculaire, il est déployé par expansion du ballonnet de manière à être amené au contact de la paroi du conduit vasculaire à élargir.

Il est connu de couvrir des stents à l'aide de substances thérapeutiquement actives destinées à agir notamment dans la zone d'implantation.

Un très grand nombre de dispositifs stents sont connus de l'art antérieur. Des méthodes et appareils pour libérer des substances actives à partir de dispositifs de type stents sont décrits par exemple dans les brevets US 6,096,070; 5,824,049; 5,624,411; 5,609,629; 5,569,463; 5,447,724; et 5,464,650. L'utilisation de stents pour la libération de médicaments est décrite par exemple dans les documents WO 01/01957, US 6,099,561; 6,071,305; 6,063,101; 5,997,468; 5,980,551; 5,980,566; 5,972,027; 5,968,092; 5,951,586; 5,893,840; 5,891,108; 5,851,231; 5,843,172; 5,837,008; 5,769,883; 5,735,811; 5,700,286; 5,679,400; 5,649,977; 5,637, 113; 5,591,227; 5,551,954; 5,545,208; 5,500,013; 5,464,450; 5,419,760; 5,411,550; 5,342,348;

5,286,254; et 5,163,952. Des méthodes d'habillage de stents sont décrites notamment dans les documents US 6,409,716; 6,464,893; et 5,356,433.

Toutefois l'art antérieur ne décrit pas de substances capables de former un habillage pour des stents, se présentant sous forme de liposome, et présentant des propriétés à la fois anti-coagulantes et immuno-modulatrices. Dans les utilisations de l'art antérieur, il faut administrer au patient deux médicaments distincts à savoir une substance anti-coagulante et une substance immuno-modulatrice.

On rappelle que les liposomes ont le grand intérêt de servir de vecteurs à la fois pour des composés pharmaceutiquement actifs apolaires et polaires. Cette forme de liposome permet ainsi d'administrer sur un même site ces deux types de composés.

L'invention vise à pallier les inconvénients de l'art antérieur, et en particulier à obtenir une composition ayant des propriétés à la fois anti-coagulantes et immuno-modulatrices, capable d'être associée à des équipements tels que des stents, et se présentant sous la forme de liposomes de manière à obtenir une libération appropriée de la substance.

Les inventeurs ont réussi à obtenir une telle substance à partir de sangsues médicinales.

De l'art antérieur est connue une méthode d'obtention d'un complexe destabilase, désigné prototype, utilisant une étape de chromatographie par affinité sur un support insoluble dans l'eau (agarose activée CNBr, par exemple) portant de la lysine immobilisée (REF). L'extrait est véhiculé par un tampon à pH inférieur au pH neutre, le pH est neutralisé, puis ont lieu une dialyse et une lyophilisation. Cependant, l'élution du produit final à partir de la lysine immobilisée à l'aide d'un tampon à faible pH inférieur à 9, ne permet pas d'obtenir un complexe destabilase apte au stockage souhaité et à l'activité enzymatique suffisante recherchée. En effet, la molécule de destabilase extraite par ce procédé se présente sous forme d'un complexe enzymatique monomérique instable qui subit un changement de conformation, qui lui fait perdre sa capacité à former un complexe enzymatique sous forme polymérique. Le complexe enzymatique sous forme de monomère n'a plus la capacité de se structurer de manière souhaitable en polymère, polymère qui s'organise en liposome. Les complexes connus (prototypes) produits par les sangsues médicinales forment un complexe d'hirudine, de prostaglandine, de destabilase, et d'inhibiteurs de kallikréine du plasma sanguin dans le rapport 1 : 1 : 1 : 1.

L'abrégié XP002237190 de la demande de brevet RU 2 129 429 C décrit un procédé pour isoler des complexes de prostaglandine provenant de sangsues

médicinales. Le procédé implique la purification du mélange par chromatographie d'affinités avec des anticorps anti 6-cétoprostaglandine-F1 immobilisés sur un support insoluble dans l'eau.

Le document de Nikonov G I et al. (« Destabilase complexes – natural liposome produced by medicinal leeches *hirudo medicinalis* » Fundamental & Clinical Pharmacology, Elsevier, Paris, FR, vol.13, n°1, 1999, pages 102-106) décrit un procédé pour produire des liposomes naturels à base de complexes de destabilase obtenus à partir de sangsues médicinales. Afin d'obtenir des complexes de destabilase ayant des propriétés de type micelle, il est procédé à :

- 10 - une extraction par des solvants organiques à partir de la tête de sangsues,
- une chromatographie d'affinités comprenant des anticorps anti-céto-PFG, immobilisés sur un substrat de sépharose 4B activé par du CNBr.

L'analyse de l'éluat est effectuée par électrophorèse. La fraction obtenue est composée d'agréat de monomère de destabilase et présente les propriétés des protéines micellaires et est représentée par un complexe stable lipides-protéines.

15 Les monomères de destabilase peuvent se mettre sous forme de polymère de complexe de destabilase formant un liposome. Lesdits liposomes présentent la capacité de pénétrer rapidement les membranes cellulaires et d'avoir une activité anti-thrombotique.

20 La demande de brevet WO 92 02206 décrit des feuilles de collagène natives lyophilisées comprenant des formulaires cosmétiques pour le traitement de la couperose. Les ingrédients actifs de la formulation cosmétique peuvent comprendre de l'hirudine, une protéine anti-coagulante provenant de sangsues.

25 La demande de brevet WO 98 16604 décrit des compositions nettoyantes, de préférence des compositions détergentes pour lessives, comprenant une enzyme de type iso-peptidase ayant la capacité de couper de manière catalytique les liaisons entre la glutamine et la lysine.

La demande de brevet WO 01 47572 décrit une méthode pour inhiber la resténose d'un vaisseau sanguin comprenant :

- 30 - la fourniture d'un dispositif comportant un composé actif ayant une activité anti-thrombotique et anti-inflammatoire, et
- l'implantation du dispositif dans le vaisseau sanguin pour inhiber la resténose dudit vaisseau sanguin.

Les inventeurs se sont donnés pour but d'obtenir un complexe de destabilase stable présentant des activités biologiques améliorées par rapport aux compositions de l'art antérieur.

Les inventeurs ont réussi à obtenir un complexe monomérique de destabilase qui est stable et capable de s'agréger en polymère s'organisant en liposome.

Ainsi l'invention a pour objet selon un premier aspect un complexe de destabilase stable, sous forme de monomère, capable de s'agréger en complexe destabilase polymère formant un liposome, susceptible d'être obtenu à partir de sangsues médicinales par un procédé comprenant :

- une chromatographie d'affinité avec lesdits anticorps de la 6-keto-prostaglandine immobilisés sur une colonne appropriée ;

- l'élution à force ionique élevée du complexe destabilase, ledit complexe présentant une activité antithrombine d'au moins 700 ATU/mg, une durée de recalcification du plasma d'au moins 800 APC/mg, une activité fibrinolytique d'au moins 40mm²/mg, et une activité immunomodulatrice.

Le procédé de purification est fait par chromatographie, de préférence chromatographie par affinité. Ce procédé comprend :

- une chromatographie d'affinité avec lesdits anticorps de la 6-keto-prostaglandine immobilisés sur une colonne appropriée, de préférence de la 6-keto-PGF1_α ;

- l'élution à force ionique élevée du complexe destabilase.

Ledit complexe de destabilase obtenu par ce procédé est sous forme de monomère et comprend de la destabilase et au moins un composé du groupe hirudine, prostaglandine, inhibiteur de kallikréine.

On peut également combiner l'action d'anticorps anti 6-keto-PGF1_α et de lysine sépharose.

Le complexe destabilase liposome présente, tout comme le complexe destabilase monomérique, des propriétés pharmaceutiques très utiles, à savoir typiquement une activité antithrombine d'au moins 500, de préférence d'au moins 600 ou 700 ATU/mg, une durée de recalcification du plasma d'au moins 800 APC/mg, une activité fibrinolytique d'au moins 40 mm²/mg. L'action antithrombique et thrombolytique est nettement améliorée par rapport au contrôle et au prototype.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un complexe destabilase liposome selon l'invention et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

5 Le terme transporteur pharmaceutiquement acceptable est utilisé pour désigner un matériau non toxique, solide ou liquide diluant ou encapsulant, qui ne réagit pas sur le composé actif de manière négative pour son efficacité.

L'invention concerne également une composition cosmétique comprenant ce complexe de destabilase liposome selon l'invention.

10 L'invention concerne également le complexe de destabilase liposome en tant que médicament, et l'utilisation d'un complexe de destabilase monomère ou polymère liposome pour la préparation d'un médicament présentant une activité anti-coagulante et immuno-modulatrice.

15 L'invention concerne également un dispositif de purification d'un complexe de destabilase à partir de sangsues médicinales, comprenant une colonne d'affinité chargée avec des anticorps anti 6-keto-prostaglandine.

L'invention concerne également une prothèse médicale implantable, dans laquelle au moins une partie de la prothèse est couverte avec un habillage, ledit habillage comprenant un complexe destabilase liposome selon l'invention.

20 Dans un mode de réalisation préféré, la prothèse implantable est un support stent. D'autres objets et avantages de l'invention apparaîtront dans la description détaillée qui suit.

25 Le procédé de purification du complexe de destabilase stable selon l'invention comprend une étape de chromatographie par affinité à l'aide d'anticorps de 6-keto-PGF1 α (6-keto-prostaglandine F1 α), immobilisés sur un support insoluble dans l'eau. Le principe de la chromatographie par immuno-affinité est connu de l'homme du métier et repose sur la spécificité d'anticorps mono ou polyclonaux pour capturer des antigènes protéiques spécifiques à partir d'extraits naturels complexes. Par contre les inventeurs ont réussi à obtenir de façon tout à fait surprenante un complexe destabilase aux activités biologiques conservées à la fois anti-coagulantes et immuno-

30 modulatrices, et capable de se structurer en liposomes.

Les anticorps sont couplés à une phase solide chromatographique, typiquement d'agarose, par des liaisons covalentes (bromure de cyanogène par exemple CNBR), ou

d'autres couplages chimiques ciblant les groupes amino, hydroxyle, carboxyle ou sulphidryle des immunoglobulines de manière à former une matrice solide. La phase solide couplée aux anticorps est alors placée dans une colonne de chromatographie par affinité. Le mélange de l'antigène cible et des contaminants est dilué dans un tampon
5 de liaison puis appliqué sur la colonne. Les contaminants non adsorbés sont éliminés par le lavage avec différents tampons. L'élution de l'antigène protéique cible est ensuite obtenue en utilisant par exemple des conditions de pH extrêmes, des changements de forces ioniques.

L'hirudine et les inhibiteurs de kallikréine ont une activité seulement dans la
10 phase aqueuse. La destabilase a une activité seulement dans la phase non aqueuse.

Le complexe de destabilase stable obtenu par les inventeurs présente des propriétés hydrophobes conditionnées par le composant prostaglandine, et des propriétés hydrophiles par les polypeptides du liposome.

La forme monomère du complexe destabilase a un poids moléculaire de 25 kDa,
15 est stable, présente une capacité d'agrégation qui se traduit par la formation de liposomes. Elle est obtenue à partir d'extraits totaux de sangsues, ou d'une fraction en particulier des sécrétions de glandes salivaires ou du sang du tube digestif de la sangsue. A l'issue de la purification par chromatographie par affinité, le complexe destabilase obtenu comprend les composants suivants : hirudine, prostaglandine
20 (substance analogue à la prostacycline), inhibiteur de kallikreine, destabilase. Le complexe destabilase présente les propriétés suivantes : activité antithrombotique par l'hirudine, augmentation du temps de recalcification du plasma sanguin par les inhibiteurs de kallikreine, blocage de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire par les substances analogues aux prostacyclines, dissolution de fibrines stabilisés par la
25 destabilase.

Ces propriétés du complexe destabilase déterminent son efficacité antithrombotique, thrombolytique (2,5 fois supérieures à celles du prototype), immuno-modulatrice, et son activité hypotensive complètement absente chez le prototype.

30 On présente ci-après les méthodes de mesure de l'activité biologique utilisées pour l'extrait de sangsues purifié et sous forme de liposome, puis quatre exemples de

réalisation démontrant l'activité à la fois anti-coagulante et immuno-modulatrice du complexe destabilase selon l'invention.

1/ L'activité antithrombine est déterminée par l'allongement de la durée de précipitation du fibrinogène par la thrombine. On détermine la durée de formation d'un précipité dans un système comprenant 0,2 ml d'une solution de fibrinogène à 0,3%, et 0,1 ml du complexe destabilase après fixation 0,1 ml d'une solution de thrombine comprenant une unité d'activité thrombine. L'activité de l'hirudine est exprimée en unités internationales antithrombines (ATU NIH).

2/ Le temps de recalcification du plasma sanguin est déterminé dans un système comprenant 0,1 ml de plasma sanguin citrique et 0,1 ml de complexe destabilase après fixation de 0,1 ml d'une solution 0,025 M de CaCl_2 . L'augmentation de ce paramètre par deux correspond à une unité APC.

3/ Le contenu en prostaglandines est déterminé en utilisant un radio immuno-essai pour le 6-keto-PGF 1_α obtenu auprès de la Compagnie « Amersham ».

4/ L'action antithrombotique du complexe destabilase est déterminée sur des rats en utilisant la méthode de thromboformation de Wessler (5). Le niveau de blocage de la thromboformation est évalué par rapport au contrôle. Pour cela on étudie les résultats suite à une séparation de 4 heures entre l'injection du complexe destabilase et une injection de sérum sanguin humain activé par le froid. Ce degré de blocage est exprimé en % par rapport au contrôle (volume égal d'une solution saline normale).

5/ L'action hypotensive est déterminée suite à l'administration orale de 0,2 ml d'un complexe destabilase chez des rats d'une lignée SHR (spontanément hypertensive). Le niveau initial de pression était de 165 ± 5 mm. Après 10 heures d'analyse, le niveau de pression chez le rat est mesuré dans la veine tail. Le niveau d'efficacité hypotensive est exprimé en pourcentage par rapport au contrôle (volume égal administré d'une solution saline normale).

6/ L'activité cytophage de neutrophiles est déterminée par la méthode connue de Chernushenko (6). Les recherches ont été effectuées sur vingt rats pubères. Une solution aqueuse de complexe destabilase a été injectée en intraveineuse quotidiennement pendant dix jours à une dose de 0,5 ml ($n = 10$). Un volume égal d'une solution 0,85% NaCl a été injecté chez des animaux contrôle ($n = 10$). A l'issue du délai approprié, du sang a été collecté chez les animaux, et l'activité cytophage des neutrophiles a été étudiée. Un index de phagocytose a été défini : un index cytophage (CI) et un pourcentage de phagocytose (Ph).

7/ L'influence sur l'activité cellulaire a été étudiée en mesurant l'inhibition de l'activité de composants du système du complément. On a utilisé également une méthode de définition de l'activité hémolytique du sérum humain dilué (7).

Les résultats ont été les suivants.

5 Exemple 1.

Le protocole est le suivant :

- Prendre dix sangsues médicinales (au total 12 g), homogénéiser, mélanger à de l'eau distillée jusqu'à obtenir un volume total d'homogénéisat de 24 ml (ratio en volumes 1:1), broyer, collecter le surnageant.
- 10 - Mettre le surnageant de l'homogénéisat sur une colonne d'agarose comportant des anticorps immobilisés anti 6-keto-PGF1 α .
L'élution est obtenue par un tampon comprenant 0,2 M de glycine avec 0,15 M HCl et 0,5 M NaCl. Le volume de l'éluat est de 35 ml.
Comme cela est visible sur le tableau 1, le produit final a une activité fibrinolytique, antithrombine, augmente le temps de recalcification, contient de la prostaglandine, et
15 en plus du fort potentiel antithrombolytique, possède une action hypotensive réduisant la pression artérielle de 25% (la ramenant pratiquement à la normale).

Exemple 2.

- 20 5 ml d'une sécrétion de glandes salivaires de sangsues ont été introduits dans une colonne d'agarose avec des anticorps immobilisés anti 6-keto-PGF1 α . L'élution est obtenue à l'aide d'un tampon phosphate 0,5 M, pH 6,4. Le volume de l'éluat est de 10 ml.
Comme indiqué sur le tableau 1, le produit final a une activité fibrinolytique
25 antithrombine, augmente le temps de recalcification, contient de la prostaglandine, et en plus d'un fort potentiel antithrombique et thrombolitique, possède une action hypotensive, réduisant la pression artérielle de 25% (la ramenant pratiquement à la normale). Le complexe destabilase augmente l'index cytophage et le pourcentage de phagocytose (tableau 1), démontrant l'action immuno-stimulative.

30

Exemple 3.

- 10 ml de sang du tube digestif de sangsues médicinales (trois mois après leur dernier repas) ont été placés dans une colonne de L-Glutamine-Sépharose. L'élution est obtenue avec une solution 1 M KCl. Le volume de l'éluat est de 20 ml. Comme
35 indiqué sur le tableau 1, le produit final a une activité fibrinolytique antithrombine,

augmente le temps de recalcification, contient de la prostaglandine, et en plus d'un fort potentiel antithrombique et thrombolytique, possède une action hypotensive, réduisant la pression artérielle de 25% (la ramenant pratiquement à la normale). Le complexe destabilase augmente l'index cytophage et le pourcentage de phagocytose (tableau 1),
5 démontrant l'action immuno-stimulative.

Exemple 4.

Le protocole est le suivant : prendre vingt sangsues médicinales (au total 21 g), extraire la partie avant de l'animal, homogénéiser, et recueillir l'extrait aqueux. 10 ml de
10 l'extrait sont placés dans une colonne de L-Lysine-Sépharose. L'élution est obtenue avec une solution 1 M KCl. Le volume de l'éluat est de 20 ml.

Comme indiqué sur le tableau 1, le produit final a une activité fibrinolytique antithrombine, augmente le temps de recalcification, contient de la prostaglandine, et en plus d'un fort potentiel antithrombique et thrombolytique, possède une action
15 hypotensive, réduisant la pression artérielle de 25% (la ramenant pratiquement à la normale). Le complexe destabilase augmente l'index cytophage et le pourcentage de phagocytose (tableau 1), démontrant l'action immuno-stimulative.

Tableau 1 : définition activités d'extraits de sangsues.

Index	Contrôle	Exemples				
		N°1	N°2	N°3	N°4	Prototype
Activité antithrombine ATU/mg	74±6	835±45	875±68	775±44	865±34	250±20
Temps de recalcification du plasma sanguin APC/mg	115±14	1025±86	930±52	950±50	1030±72	438±35
Activité fibrinolytique Mm ² /mg	9±4	58±5	49±5	52±7	50±6	26±5
Prostaglandines ng/mg	729±35	955±20	800±34	870±54	900±44	85±13
% action antithrombotique	60±4	100	100	100	100	65±5
% action thrombolytique	10±5	80±5	75±5	70±5	75±5	10±5
% action hypotensive	8±3	25±5	25±5	20±5	25±5	0
Index cytophage	1,8±0,7	6,4±1,1	5,9±0,8	6,3±1,0	6,0±0,7	0,8±0,3
% phagocytoses	45,4±6,3	75,4±6,0	71,4±7,3	68,5±8,0	69,7±6,6	35,7±6,7
Activité immuno-modulatrice	-	+	+	+	+	-

- 5 En ce qui concerne l'application de l'extrait purifié sur les stents, l'homme du métier dispose d'un grand nombre de méthodes possibles. Ainsi les stents supports du complexe destabilase obtenu par les inventeurs peuvent être de types très variés. Par exemple un stent présentera une surface polymérique externe sur laquelle sera placée une matrice gélatineuse, la matrice incluant le complexe de destabilase sous forme de liposomes. Selon une réalisation, la surface polymérique sera liée par des liaisons
- 10

covalentes avec la matrice gélatineuse. Le gel polymérique peut avoir par exemple une épaisseur de 10 à 50µm à l'état non comprimé. Ce gel peut être choisi par exemple dans le groupe constitué par des acides polycarboxyliques, des polymères cellulosiques, de la gélatine, de la polyvinylpyrrolidone, des polymères anhydrides maléiques, des polyamides, des alcools polyvinyliques, des oxydes de polyéthylène, de l'acide polyacrylique.

REVENDICATIONS

1. Complexe de destabilase stable, sous forme de monomère, capable de s'agréger en complexe destabilase polymère formant un liposome, susceptible d'être obtenu à partir de sangsues médicinales par un procédé comprenant :

- une chromatographie d'affinité avec lesdits anticorps de la 6-keto-prostaglandine immobilisés sur une colonne appropriée ;

- l'élution à force ionique élevée du complexe destabilase,

caractérisé en ce qu'il présente une activité antithrombine d'au moins 700 ATU/mg, une durée de recalcification du plasma d'au moins 800 APC/mg, une activité fibrinolytique d'au moins 40mm²/mg, et une activité immunomodulatrice.

2. Composition pharmaceutique comprenant un complexe destabilase selon la revendication 1 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

3. Composition cosmétique comprenant un complexe de destabilase selon la revendication 1.

4. Complexe de destabilase selon la revendication 1 en tant que médicament.

5. Utilisation d'un complexe de destabilase selon la revendication 1 pour la préparation d'un médicament présentant une activité anti-coagulante et immunomodulatrice.

6. Prothèse médicale implantable, dans laquelle au moins une partie de la prothèse est couverte avec un habillage, ledit habillage comprenant un complexe de destabilase selon la revendication 1.

7. Prothèse implantable selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un support stent.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/03/02473

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N/64 A61K38/48 A61L33/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12N A61L C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200026 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2000-301505 XP002237190 & RU 2 129 429 C (MOSC BLOKON STOCK CO), 27 avril 1999 (1999-04-27) cité dans la demande	1,2,4,5
Y	abrégé --- -/--	3,6,7

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *G* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 janvier 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/01/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Van der Schaal, C

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	NIKONOV G I ET AL: "DESTABILASE COMPLEXES - NATURAL LIPOSOME PRODUCED BY MEDICINAL LEECHES HIRUDO MEDICINALIS" FUNDAMENTAL & CLINICAL PHARMACOLOGY, ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 13, no. 1, 1999, pages 102-106, XP008007736 ISSN: 0767-3981 cité dans la demande le document en entier	1,2,4,5
Y	WO 92 02206 A (ARVAL SPA) 20 février 1992 (1992-02-20) cité dans la demande le document en entier	3,6,7
Y	WO 98 16604 A (GREEN PHILLIP RICHARD ;PROCTER & GAMBLE (US)) 23 avril 1998 (1998-04-23) cité dans la demande le document en entier	3
Y	WO 01 47572 A (ADVANCED CARDIOVASCULAR SYSTEM) 5 juillet 2001 (2001-07-05) le document en entier	6,7
A	EP 0 753 304 A (INST BIOORG CHIMII) 15 janvier 1997 (1997-01-15)	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/02473

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
RU 2129429	C	27-04-1999	RU 2129429 C1	27-04-1999
WO 9202206	A	20-02-1992	IT 1243196 B AU 8235291 A WO 9202206 A1	24-05-1994 02-03-1992 20-02-1992
WO 9816604	A	23-04-1998	CA 2268009 A1 CN 1239986 A EP 0951528 A2 JP 2000510903 T WO 9816604 A2	23-04-1998 29-12-1999 27-10-1999 22-08-2000 23-04-1998
WO 0147572	A	05-07-2001	AU 2599501 A WO 0147572 A2 US 2001007083 A1	09-07-2001 05-07-2001 05-07-2001
EP 0753304	A	15-01-1997	RU 2112528 C1 EP 0753304 A1 JP 10501422 T CN 1146723 A WO 9619999 A1	10-06-1998 15-01-1997 10-02-1998 02-04-1997 04-07-1996

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
19 février 2004 (19.02.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/015096 A2(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 9/64,
A61K 38/48, A61L 33/00(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002473

(22) Date de dépôt international : 6 août 2003 (06.08.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/10042 7 août 2002 (07.08.2002) FR(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : RI-
CARIMPEX [FR/FR]; 245, avenue de Saint Médard,
F-33320 Eysines (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : LA-
TRILLE, Jacques [FR/FR]; 245, avenue de Saint
Médard, F-33320 Eysines (FR). NIKONOV, Guennady,
I. [RU/RU]; Kamensky District, Pes Oktobriaskaya (RU).(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques. etc.; Cabinet
Regimbeau, 20 rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17
(FR).(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapportEn ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: LEECH EXTRACTS FOR STENTS

(54) Titre : EXTRAITS DE SANGSUES POUR STENTS

(57) Abstract: The invention relates to a stable destabilase complex in the form of a monomer, which is capable of aggregating into a polymer destabilase complex forming a liposome and which can be obtained from medicinal leeches using the following method comprising: affinity chromatography with 6-keto-prostaglandin antibodies which are immobilised on a suitable column; and high ionic strength elution of the destabilase complex, said complex having an antithrombin activity of at least 700 ATU/mg, a plasma recalcification time of at least 800 APC/mg, a fibrinolytic activity of at least 40mm²/mg and an immunomodulating activity.(57) Abrégé : La présente invention concerne un complexe de destabilase stable, sous forme de monomère, capable de s'agréger en complexe destabilase polymère formant un liposome, susceptible d'être obtenu à partir de sangsues médicinales par un procédé comprenant- une chromatographie d'affinité avec lesdits anticorps de la 6-ketoprostaglandine immobilisés sur une colonne appropriée ; - l'éluion à force ionique élevée du complexe destabilase, ledit complexe présentant une activité antithrombine d'au moins 700 ATU/mg, une durée de recalcification du plasma d'au moins 800 APC/mg, une activité fibrinolytique d'au moins 40mm²/mg, et une activité immunomodulatrice.

WO 2004/015096 A2

Extraits de sangsues pour stents

L'invention concerne l'obtention de substances biologiquement actives à propriétés cosmétiques ou pharmaceutiques se présentant sous forme de liposomes. Plus précisément ces liposomes sont des liposomes naturels extraits de sangsues médicinales. Ces liposomes naturels présentent des propriétés à la fois anti-coagulantes et immuno-modulatrices.

On connaît déjà des composés ayant des propriétés anti-coagulantes, tels que l'héparine, et des composés ayant des propriétés immuno-modulatrices. De tels composés sont utilisés en thérapeutique, et administrés par exemple par l'intermédiaire de supports physiquement acceptables dénommés « stents ».

Ces stents sont des endoprothèses, couramment utilisés en chirurgie cardiovasculaire pour être implantés dans un conduit vasculaire, notamment artère coronaire ou artère périphérique. Il est connu de traiter les maladies athéromateuses vasculaires, qui correspondent à des rétrécissements des artères, par des techniques de dilatation par ballonnet, techniques dénommées angioplasties. Le ballonnet est introduit dans l'artère, gonflé à une pression telle qu'il écrase le dépôt d'athéromes. Ces techniques n'étant toutefois pas toujours suffisantes, il est connu d'implanter dans le conduit vasculaire au niveau de la zone traitée par angioplastie, une endoprothèse plus communément appelée stent, typiquement support métallique agissant comme tuteur une fois qu'il est introduit à l'intérieur de l'artère au niveau de la zone traitée. De tels stents sont par exemple sertis sur le ballonnet, dans une position dite de repos, préalablement à l'introduction du ballonnet dans le conduit vasculaire. Une fois le stent acheminé jusqu'à la zone d'implantation à l'intérieur du conduit vasculaire, il est déployé par expansion du ballonnet de manière à être amené au contact de la paroi du conduit vasculaire à élargir.

Il est connu de couvrir des stents à l'aide de substances thérapeutiquement actives destinées à agir notamment dans la zone d'implantation.

Un très grand nombre de dispositifs stents sont connus de l'art antérieur. Des méthodes et appareils pour libérer des substances actives à partir de dispositifs de type stents sont décrits par exemple dans les brevets US 6,096,070; 5,824,049; 5,624,411; 5,609,629; 5,569,463; 5,447,724; et 5,464,650. L'utilisation de stents pour la libération de médicaments est décrite par exemple dans les documents WO 01/01957, US 6,099,561; 6,071,305; 6,063,101; 5,997,468; 5,980,551; 5,980,566; 5,972,027; 5,968,092; 5,951,586; 5,893,840; 5,891,108; 5,851,231; 5,843,172; 5,837,008; 5,769,883; 5,735,811; 5,700,286; 5,679,400; 5,649,977; 5,637, 113; 5,591,227; 5,551,954; 5,545,208; 5,500,013; 5,464,450; 5,419,760; 5,411,550; 5,342,348;

5,286,254; et 5,163,952. Des méthodes d'habillage de stents sont décrites notamment dans les documents US 6,409,716; 6,464,893; et 5,356,433.

Toutefois l'art antérieur ne décrit pas de substances capables de former un habillage pour des stents, se présentant sous forme de liposome, et présentant des propriétés à la fois anti-coagulantes et immuno-modulatrices. Dans les utilisations de l'art antérieur, il faut administrer au patient deux médicaments distincts à savoir une substance anti-coagulante et une substance immuno-modulatrice.

On rappelle que les liposomes ont le grand intérêt de servir de vecteurs à la fois pour des composés pharmaceutiquement actifs apolaires et polaires. Cette forme liposome permet ainsi d'administrer sur un même site ces deux types de composés.

L'invention vise à pallier les inconvénients de l'art antérieur, et en particulier à obtenir une composition ayant des propriétés à la fois anti-coagulantes et immuno-modulatrices, capable d'être associée à des équipements tels que des stents, et se présentant sous la forme de liposomes de manière à obtenir une libération appropriée de la substance.

Les inventeurs ont réussi à obtenir une telle substance à partir de sangsues médicinales.

De l'art antérieur est connue une méthode d'obtention d'un complexe destabilase, désigné prototype, utilisant une étape de chromatographie par affinité sur un support insoluble dans l'eau (agarose activée CNBr, par exemple) portant de la lysine immobilisée (REF). L'extrait est véhiculé par un tampon à pH inférieur au pH neutre, le pH est neutralisé, puis ont lieu une dialyse et une lyophilisation. Cependant, l'élution du produit final à partir de la lysine immobilisée à l'aide d'un tampon à faible pH inférieur à 9, ne permet pas d'obtenir un complexe destabilase apte au stockage souhaité et à l'activité enzymatique suffisante recherchée. En effet, la molécule de destabilase extraite par ce procédé se présente sous forme d'un complexe enzymatique monomérique instable qui subit un changement de conformation, qui lui fait perdre sa capacité à former un complexe enzymatique sous forme polymérique. Le complexe enzymatique sous forme de monomère n'a plus la capacité de se structurer de manière souhaitable en polymère, polymère qui s'organise en liposome. Les complexes connus (prototypes) produits par les sangsues médicinales forment un complexe d'hirudine, de prostaglandine, de destabilase, et d'inhibiteurs de kallikréine du plasma sanguin dans le rapport 1 :1 :1 :1.

L'abrégé XP002237190 de la demande de brevet RU 2 129 429 C décrit un procédé pour isoler des complexes de prostaglandine provenant de sangsues

médicinales. Le procédé implique la purification du mélange par chromatographie d'affinités avec des anticorps anti 6-cétoprostaglandine-F1 immobilisés sur un support insoluble dans l'eau.

Le document de Nikonov G I et al. (« Destabilase complexes – natural liposome produced by medicinal leeches *hirudo medicinalis* » Fundamental & Clinical Pharmacology, Elsevier, Paris, FR, vol.13, n°.1, 1999, pages 102-106) décrit un procédé pour produire des liposomes naturels à base de complexes de destabilase obtenus à partir de sangsues médicinales. Afin d'obtenir des complexes de destabilase ayant des propriétés de type micelle, il est procédé à :

- 10 - une extraction par des solvants organiques à partir de la tête de sangsues,
- une chromatographie d'affinités comprenant des anticorps anti-céto-PFG, immobilisés sur un substrat de sépharose 4B activé par du CNBr.

L'analyse de l'éluat est effectuée par électrophorèse. La fraction obtenue est composée d'agrégat de monomère de destabilase et présente les propriétés des protéines micellaires et est représentée par un complexe stable lipides-protéines.

15 Les monomères de destabilase peuvent se mettre sous forme de polymère de complexe de destabilase formant un liposome. Lesdits liposomes présentent la capacité de pénétrer rapidement les membranes cellulaires et d'avoir une activité anti-thrombotique.

20 La demande de brevet WO 92 02206 décrit des feuilles de collagène natives lyophilisées comprenant des formulaires cosmétiques pour le traitement de la couperose. Les ingrédients actifs de la formulation cosmétique peuvent comprendre de l'hirudine, une protéine anti-coagulante provenant de sangsues.

25 La demande de brevet WO 98 16604 décrit des compositions nettoyantes, de préférence des compositions détergentes pour lessives, comprenant une enzyme de type iso-peptidase ayant la capacité de couper de manière catalytique les liaisons entre la glutamine et la lysine.

La demande de brevet WO 01 47572 décrit une méthode pour inhiber la resténose d'un vaisseau sanguin comprenant :

- 30 - la fourniture d'un dispositif comportant un composé actif ayant une activité anti-thrombotique et anti-inflammatoire, et
- l'implantation du dispositif dans le vaisseau sanguin pour inhiber la resténose dudit vaisseau sanguin.

Les inventeurs se sont donnés pour but d'obtenir un complexe de destabilase stable présentant des activités biologiques améliorées par rapport aux compositions de l'art antérieur.

Les inventeurs ont réussi à obtenir un complexe monomérique de destabilase qui est stable et capable de s'agréger en polymère s'organisant en liposome.

Ainsi l'invention a pour objet selon un premier aspect un complexe de destabilase stable, sous forme de monomère, capable de s'agréger en complexe destabilase polymère formant un liposome, susceptible d'être obtenu à partir de sangsues médicinales par un procédé comprenant :

- une chromatographie d'affinité avec lesdits anticorps de la 6-keto-prostaglandine immobilisés sur une colonne appropriée ;

- l'élution à force ionique élevée du complexe destabilase, ledit complexe présentant une activité antithrombine d'au moins 700 ATU/mg, une durée de recalcification du plasma d'au moins 800 APC/mg, une activité fibrinolytique d'au moins 40mm²/mg, et une activité immunomodulatrice.

Le procédé de purification est fait par chromatographie, de préférence chromatographie par affinité. Ce procédé comprend :

- une chromatographie d'affinité avec lesdits anticorps de la 6-keto-prostaglandine immobilisés sur une colonne appropriée, de préférence de la 6-keto-PGF1_α ;

- l'élution à force ionique élevée du complexe destabilase.

Ledit complexe de destabilase obtenu par ce procédé est sous forme de monomère et comprend de la destabilase et au moins un composé du groupe hirudine, prostaglandine, inhibiteur de kallikréine.

On peut également combiner l'action d'anticorps anti 6-keto-PGF1_α et de lysine sépharose.

Le complexe destabilase liposome présente, tout comme le complexe destabilase monomérique, des propriétés pharmaceutiques très utiles, à savoir typiquement une activité antithrombine d'au moins 500, de préférence d'au moins 600 ou 700 ATU/mg, une durée de recalcification du plasma d'au moins 800 APC/mg, une activité fibrinolytique d'au moins 40 mm²/mg. L'action antithrombique et thrombolytique est nettement améliorée par rapport au contrôle et au prototype.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un complexe destabilase liposome selon l'invention et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

5 Le terme transporteur pharmaceutiquement acceptable est utilisé pour désigner un matériau non toxique, solide ou liquide diluant ou encapsulant, qui ne réagit pas sur le composé actif de manière négative pour son efficacité.

L'invention concerne également une composition cosmétique comprenant ce complexe de destabilase liposome selon l'invention.

10 L'invention concerne également le complexe de destabilase liposome en tant que médicament, et l'utilisation d'un complexe de destabilase monomère ou polymère liposome pour la préparation d'un médicament présentant une activité anti-coagulante et immuno-modulatrice.

15 L'invention concerne également un dispositif de purification d'un complexe de destabilase à partir de sangsues médicinales, comprenant une colonne d'affinité chargée avec des anticorps anti 6-keto-prostaglandine.

L'invention concerne également une prothèse médicale implantable, dans laquelle au moins une partie de la prothèse est couverte avec un habillage, ledit habillage comprenant un complexe destabilase liposome selon l'invention.

20 Dans un mode de réalisation préféré, la prothèse implantable est un support stent. D'autres objets et avantages de l'invention apparaîtront dans la description détaillée qui suit.

Le procédé de purification du complexe de destabilase stable selon l'invention comprend une étape de chromatographie par affinité à l'aide d'anticorps de 6-keto-PGF₁ α (6-keto-prostaglandine F₁ α), immobilisés sur un support insoluble dans l'eau.

25 Le principe de la chromatographie par immuno-affinité est connu de l'homme du métier et repose sur la spécificité d'anticorps mono ou polyclonaux pour capturer des antigènes protéiques spécifiques à partir d'extraits naturels complexes. Par contre les inventeurs ont réussi à obtenir de façon tout à fait surprenante un complexe destabilase aux activités biologiques conservées à la fois anti-coagulantes et immuno-

30 modulatrices, et capable de se structurer en liposomes.

Les anticorps sont couplés à une phase solide chromatographique, typiquement d'agarose, par des liaisons covalentes (bromure de cyanogène par exemple CNBR), ou

d'autres couplages chimiques ciblant les groupes amino, hydroxyle, carboxyle ou sulphidryle des immunoglobulines de manière à former une matrice solide. La phase solide couplée aux anticorps est alors placée dans une colonne de chromatographie par affinité. Le mélange de l'antigène cible et des contaminants est dilué dans un tampon
5 de liaison puis appliqué sur la colonne. Les contaminants non adsorbés sont éliminés par le lavage avec différents tampons. L'élution de l'antigène protéique cible est ensuite obtenue en utilisant par exemple des conditions de pH extrêmes, des changements de forces ioniques.

L'hirudine et les inhibiteurs de kallikréine ont une activité seulement dans la
10 phase aqueuse. La destabilase a une activité seulement dans la phase non aqueuse.

Le complexe de destabilase stable obtenu par les inventeurs présente des propriétés hydrophobes conditionnées par le composant prostaglandine, et des propriétés hydrophiles par les polypeptides du liposome.

La forme monomère du complexe destabilase a un poids moléculaire de 25 kDa,
15 est stable, présente une capacité d'agrégation qui se traduit par la formation de liposomes. Elle est obtenue à partir d'extraits totaux de sangsues, ou d'une fraction en particulier des sécrétions de glandes salivaires ou du sang du tube digestif de la sangsue. A l'issue de la purification par chromatographie par affinité, le complexe destabilase obtenu comprend les composants suivants : hirudine, prostaglandine
20 (substance analogue à la prostacycline), inhibiteur de kallikréine, destabilase. Le complexe destabilase présente les propriétés suivantes : activité antithrombotique par l'hirudine, augmentation du temps de recalcification du plasma sanguin par les inhibiteurs de kallikréine, blocage de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire par les substances analogues aux prostacyclines, dissolution de fibrines stabilisés par la
25 destabilase.

Ces propriétés du complexe destabilase déterminent son efficacité antithrombotique, thrombolytique (2,5 fois supérieures à celles du prototype), immuno-modulatrice, et son activité hypotensive complètement absente chez le prototype.

30 On présente ci-après les méthodes de mesure de l'activité biologique utilisées pour l'extrait de sangsues purifié et sous forme de liposome, puis quatre exemples de

réalisation démontrant l'activité à la fois anti-coagulante et immuno-modulatrice du complexe destabilase selon l'invention.

- 1/ L'activité antithrombine est déterminée par l'allongement de la durée de précipitation du fibrinogène par la thrombine. On détermine la durée de formation d'un précipité dans un système comprenant 0,2 ml d'une solution de fibrinogène à 0,3%, et 0,1 ml du complexe destabilase après fixation 0,1 ml d'une solution de thrombine comprenant une unité d'activité thrombine. L'activité de l'hirudine est exprimée en unités internationales antithrombines (ATU NIH).
- 2/ Le temps de recalcification du plasma sanguin est déterminé dans un système comprenant 0,1 ml de plasma sanguin citrique et 0,1 ml de complexe destabilase après fixation de 0,1 ml d'une solution 0,025 M de CaCl_2 . L'augmentation de ce paramètre par deux correspond à une unité APC.
- 3/ Le contenu en prostaglandines est déterminé en utilisant un radio immuno-essai pour le 6-keto-PGF 1_α obtenu auprès de la Compagnie « Amersham ».
- 4/ L'action antithrombotique du complexe destabilase est déterminée sur des rats en utilisant la méthode de thromboformation de Wessler (5). Le niveau de blocage de la thromboformation est évalué par rapport au contrôle. Pour cela on étudie les résultats suite à une séparation de 4 heures entre l'injection du complexe destabilase et une injection de sérum sanguin humain activé par le froid. Ce degré de blocage est exprimé en % par rapport au contrôle (volume égal d'une solution saline normale).
- 5/ L'action hypotensive est déterminée suite à l'administration orale de 0,2 ml d'un complexe destabilase chez des rats d'une lignée SHR (spontanément hypertensive). Le niveau initial de pression était de 165 ± 5 mm. Après 10 heures d'analyse, le niveau de pression chez le rat est mesuré dans la veine tail. Le niveau d'efficacité hypotensive est exprimé en pourcentage par rapport au contrôle (volume égal administré d'une solution saline normale).
- 6/ L'activité cytophage de neutrophiles est déterminée par la méthode connue de Chernushenko (6). Les recherches ont été effectuées sur vingt rats pubères. Une solution aqueuse de complexe destabilase a été injectée en intraveineuse quotidiennement pendant dix jours à une dose de 0,5 ml ($n = 10$). Un volume égal d'une solution 0,85% NaCl a été injecté chez des animaux contrôle ($n = 10$). A l'issue du délai approprié, du sang a été collecté chez les animaux, et l'activité cytophage des neutrophiles a été étudiée. Un index de phagocytose a été défini : un index cytophage (CI) et un pourcentage de phagocytose (Ph).

7/ L'influence sur l'activité cellulaire a été étudiée en mesurant l'inhibition de l'activité de composants du système du complément. On a utilisé également une méthode de définition de l'activité hémolytique du sérum humain dilué (7).

Les résultats ont été les suivants.

5 Exemple 1.

Le protocole est le suivant :

- Prendre dix sangsues médicinales (au total 12 g), homogénéiser, mélanger à de l'eau distillée jusqu'à obtenir un volume total d'homogénéisat de 24 ml (ratio en volumes 1 : 1), broyer, collecter le surnageant.
- 10 - Mettre le surnageant de l'homogénéisat sur une colonne d'agarose comportant des anticorps immobilisés anti 6-keto-PGF1 α .

L'élution est obtenue par un tampon comprenant 0,2 M de glycine avec 0,15 M HCl et 0,5 M NaCl. Le volume de l'éluat est de 35 ml.

- 15 Comme cela est visible sur le tableau 1, le produit final a une activité fibrinolytique, antithrombine, augmente le temps de recalcification, contient de la prostaglandine, et en plus du fort potentiel antithrombolytique, possède une action hypotensive réduisant la pression artérielle de 25% (la ramenant pratiquement à la normale).

Exemple 2.

- 20 5 ml d'une sécrétion de glandes salivaires de sangsues ont été introduits dans une colonne d'agarose avec des anticorps immobilisés anti 6-keto-PGF1 α . L'élution est obtenue à l'aide d'un tampon phosphate 0,5 M, pH 6,4. Le volume de l'éluat est de 10 ml.

- 25 Comme indiqué sur le tableau 1, le produit final a une activité fibrinolytique antithrombine, augmente le temps de recalcification, contient de la prostaglandine, et en plus d'un fort potentiel antithrombique et thrombolitique, possède une action hypotensive, réduisant la pression artérielle de 25% (la ramenant pratiquement à la normale). Le complexe destabilase augmente l'index cytophage et le pourcentage de phagocytose (tableau 1), démontrant l'action immuno-stimulative.

30

Exemple 3.

- 10 ml de sang du tube digestif de sangsues médicinales (trois mois après leur dernier repas) ont été placés dans une colonne de L-Glutamine-Sépharose. L'élution est obtenue avec une solution 1 M KCl. Le volume de l'éluat est de 20 ml. Comme
- 35 indiqué sur le tableau 1, le produit final a une activité fibrinolytique antithrombine,

- augmente le temps de recalcification, contient de la prostaglandine, et en plus d'un fort potentiel antithrombique et thrombolytique, possède une action hypotensive, réduisant la pression artérielle de 25% (la ramenant pratiquement à la normale). Le complexe destabilase augmente l'index cytophage et le pourcentage de phagocytose (tableau 1),
- 5 démontrant l'action immuno-stimulative.

Exemple 4.

- Le protocole est le suivant : prendre vingt sangsues médicinales (au total 21 g), extraire la partie avant de l'animal, homogénéiser, et recueillir l'extrait aqueux. 10 ml de
- 10 l'extrait sont placés dans une colonne de L-Lysine-Sépharose. L'élution est obtenue avec une solution 1 M KCl. Le volume de l'éluat est de 20 ml.

- Comme indiqué sur le tableau 1, le produit final a une activité fibrinolytique antithrombine, augmente le temps de recalcification, contient de la prostaglandine, et en plus d'un fort potentiel antithrombique et thrombolytique, possède une action
- 15 hypotensive, réduisant la pression artérielle de 25% (la ramenant pratiquement à la normale). Le complexe destabilase augmente l'index cytophage et le pourcentage de phagocytose (tableau 1), démontrant l'action immuno-stimulative.

Tableau 1 : définition activités d'extraits de sangsues.

Index	Contrôle	Exemples				
		N°1	N°2	N°3	N°4	Prototype
Activité antithrombine ATU/mg	74±6	835±45	875±68	775±44	865±34	250±20
Temps de recalcification du plasma sanguin APC/mg	115±14	1025±86	930±52	950±50	1030±72	438±35
Activité fibrinolytique Mm ² /mg	9±4	58±5	49±5	52±7	50±6	26±5
Prostaglandines ηg/mg	729±35	955±20	800±34	870±54	900±44	85±13
% action antithrombotique	60±4	100	100	100	100	65±5
% action thrombolytique	10±5	80±5	75±5	70±5	75±5	10±5
% action hypotensive	8±3	25±5	25±5	20±5	25±5	0
Index cytophage	1,8±0,7	6,4±1,1	5,9±0,8	6,3±1,0	6,0±0,7	0,8±0,3
% phagocytoses	45,4±6,3	75,4±6,0	71,4±7,3	68,5±8,0	69,7±6,6	35,7±6,7
Activité immuno-modulatrice	-	+	+	+	+	-

- 5 En ce qui concerne l'application de l'extrait purifié sur les stents, l'homme du métier dispose d'un grand nombre de méthodes possibles. Ainsi les stents supports du complexe destabilase obtenu par les inventeurs peuvent être de types très variés. Par exemple un stent présentera une surface polymérique externe sur laquelle sera placée une matrice gélatineuse, la matrice incluant le complexe de destabilase sous forme de
- 10 liposomes. Selon une réalisation, la surface polymérique sera liée par des liaisons

covalentes avec la matrice gélativeuse. Le gel polymérique peut avoir par exemple une épaisseur de 10 à 50µm à l'état non comprimé. Ce gel peut être choisi par exemple dans le groupe constitué par des acides polycarboxyliques, des polymères cellulosiques, de la gélatine, de la polyvinylpyrrolidone, des polymères anhydrides maléiques, des polyamides, des alcools polyvinyliques, des oxydes de polyéthylène, de l'acide polyacrylique.

REVENDICATIONS

1. Complexe de destabilase stable, sous forme de monomère, capable de s'agréger en complexe destabilase polymère formant un liposome, susceptible d'être obtenu à partir de sangsues médicinales par un procédé comprenant :

- une chromatographie d'affinité avec lesdits anticorps de la 6-keto-prostaglandine immobilisés sur une colonne appropriée ;

- l'élution à force ionique élevée du complexe destabilase,

caractérisé en ce qu'il présente une activité antithrombine d'au moins 700 ATU/mg, une durée de recalcification du plasma d'au moins 800 APC/mg, une activité fibrinolytique d'au moins 40mm²/mg, et une activité immunomodulatrice.

2. Composition pharmaceutique comprenant un complexe destabilase selon la revendication 1 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

3. Composition cosmétique comprenant un complexe de destabilase selon la revendication 1.

4. Complexe de destabilase selon la revendication 1 en tant que médicament.

5. Utilisation d'un complexe de destabilase selon la revendication 1 pour la préparation d'un médicament présentant une activité anti-coagulante et immunomodulatrice.

6. Prothèse médicale implantable, dans laquelle au moins une partie de la prothèse est couverte avec un habillage, ledit habillage comprenant un complexe de destabilase selon la revendication 1.

7. Prothèse implantable selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un support stent.